昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*, September 2014, 57(9): 1051 - 1060　　ISSN 0454-6296

# 基于线粒体 COI 基因序列的大豆食心虫中国东北地理种群遗传多样性分析

王　红[1], 徐忠新[1], 韩岚岚[1], 王克勤[2], 赵奎军[1,*]

(1. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院植物保护研究所, 哈尔滨 150086)

**摘要:**【目的】大豆食心虫 *Leguminivora glycinivorella* (Matsumura)是一种危害大豆的主要害虫,在中国北方地区危害较重。本研究旨在探讨大豆食心虫在中国东北不同地理种群间的遗传变异。【方法】测定了 10 个不同地理种群 153 个个体的线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (mtCOI)基因的 657 bp 序列,利用 DnaSP 5. 0 和 Arlequin 3. 5. 1. 2 等软件对大豆食心虫种群间的遗传多样性、基因流水平和分子变异进行分析。【结果】结果表明:10 个地理种群间的 COI 基因共有 36 个变异位点和 17 个单倍型,其中 1 个单倍型为 10 个种群所共享。总种群的单倍型多样性指数 *Hd* 为 0.456,各地理种群单倍型多样度范围在 0 ~ 0.634 之间。总群体的固定系数 *Fst* 为 0.12545,遗传分化系数 *Gst* 为 0.06326,总基因流 *Nm* 为 3.49,且各种群间的基因流均大于 1,种群间基因交流的水平较高。【结论】大豆食心虫种群内遗传多样性水平处于中低等水平。总群体和各种群的 Tajima's *D* 检验结果皆不显著,说明中国东北地区大豆食心虫在较近的历史时期内没有出现种群扩张现象。AMOVA 分子变异分析结果表明,大豆食心虫的遗传分化主要来自种群内部,而种群间未发生明显的遗传分化。各地理种群的单倍型在系统发育树上和中介网络图上散布在不同的分布群中,缺乏明显的地理分布格局。各种群的遗传距离与地理距离之间没有显著线性相关性,种群间的基因交流并未受到地理距离的影响。

**关键词:** 大豆食心虫; 线粒体 COI 基因; 单倍型; 地理种群; 遗传多样性; 基因流

**中图分类号:** Q968　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2014)09-1051-10

# Analysis of the genetic diversity in geographic populations of *Leguminivora glycinivorella* (Lepidoptera: Olethreutidae) from northeastern China based on mitochondrial DNA COI gene sequences

WANG Hong[1], XU Zhong-Xin[1], HAN Lan-Lan[1], WANG Ke-Qin[2], ZHAO Kui-Jun[1,*] (1. College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Institute of Plant Protection, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

**Abstract:**【Aim】The soybean podborer, *Leguminivora glycinivorella* (Matsumura), is a major insect pest of soybean *Glycina max*, and it damages *G. max* seriously in northeastern China. This study aims to investigate the genetic differentiation among geographic populations of *L. glycinivorella* in northeastern China.【Methods】A 657-bp segment of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene of 153 individuals from 10 geographic populations in northeastern China was sequenced and analyzed. The genetic diversity, gene flow and molecular variance were analyzed using DnaSP 5. 0 and Arlequin 3. 5. 1. 2.【Results】The results showed that 36 variable sites were detected, and 17 haplotypes were defined based on the COI sequences of 10 geographic populations of *L. glycinivorella*, including one haplotype shared by all the 10 populations. The total haplotype diversity of all populations was 0. 456, and the range of haplotype diversity of different populations was 0 - 0. 634. The total *Fst*, *Gst* and *Nm* were 0. 12545, 0. 06326 and 3. 49, respectively, and all pairwise gene flow *Nm* was greater than 1 in the 10 populations, suggesting that extensive gene flow occurred among the ten populations of *L. glycinivorella*.【Conclusion】The *L. glycinivorella* populations are characterized by medium/low genetic diversity. The Tajima's *D* test indicated that there might not have been a recent population expansion.

---

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-04); 公益性行业(农业)专项基金(201103002)

作者简介: 王红, 女, 1987 年 4 月生, 黑龙江哈尔滨人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生态学, E-mail: wanghonglv@126.com

[*] 通讯作者 Corresponding author, E-mail: kjzhao@163.com

收稿日期 Received: 2014-04-05; 接受日期 Accepted: 2014-09-11

Molecular variance analysis (AMOVA) demonstrated that the observed genetic differentiation occurs primarily within populations, and there is no obvious genetic differentiation among populations. The neighbor-joining phylogenetic tree and haplotype network showed that the haplotypes are distributed in different clades and no obvious geographical structure has been formed. The genetic distance is not significantly correlated with the geographical distance between populations, and the gene flow is not affected by geographical distance.

**Key words**: *Leguminivora glycinivorella*; mtDNA COI gene; haplotype; geographic population; genetic diversity; gene flow

大豆食心虫 *Leguminivora glycinivorella*（Mats.）又名大豆蛀荚蛾、小红虫、豆荚虫，属鳞翅目（Lepidoptera），小卷蛾科（Olethreutidae）。在中国主要分布于东北，华北，西北及湖北、江苏、浙江、安徽、山东等地，以东北三省受害最为严重，日本、朝鲜及远东沿海边区也有分布。其食性相对较单一，以幼虫钻蛀咬食豆粒为害（杨啸等，2012），主要为害大豆 *Glycina max*、野生大豆 *Glycine ussuriensis* 和苦参 *Sopha flavescens*。在中国，虫食率通常为 10% ~ 30%，严重时可达 50% 以上，因地区、年度气候变化、大豆品种的不同而差别很大，严重影响大豆产量和品质（吴炳芝，2001）。

目前尚没有从遗传分化的分子特性对大豆食心虫地理种群进行遗传变异分析的相关报道。随着分子生物学的发展和应用，分子标记越来越多地被应用于昆虫遗传研究中去，在众多的分子标记技术中，线粒体 DNA 具有提取技术简单、母系遗传、进化速率较核基因快等特点（Harrison, 1989），被广泛应用于昆虫系统进化及种群的遗传变异中（Avise *et al.*, 1987; Barrio *et al.*, 1992; Miya *et al.*, 2003）。例如，COI，COII 和 16S rDNA 等经常用于分析亲缘关系密切的种、亚种及地理种群之间的系统关系（Xu Q *et al.*, 2009；李菁等，2010；魏书军等，2011；Xu DD *et al.*, 2012；孙嵬等，2013）。本研究针对大豆食心虫因迁飞能力弱而导致长期地理隔离的特点，利用线粒体 COI 基因作为分子标记，测定了东北地区大豆食心虫 10 个地理种群线粒体 COI 基因序列，以胡桃小卷蛾 *Cydia caryana* 的线粒体 COI 基因片段（658 bp）（GenBank 登录号：GU088344.1）为对照，从种群内及种群间的基因遗传分化程度和基因交流水平对大豆食心虫的地理种群遗传多样性进行了分析，为探讨大豆食心虫不同地理种群间的系统发育及进化关系提供遗传学信息，进而为该虫的区域性控制和防治策略提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试虫源

本研究以东北三省大豆食心虫危害较重的 10 个地理种群的老熟幼虫作为供试虫源。寄主均为当地种植的栽培大豆，采用随机取样的方法进行采集，在大豆晚熟期拨开表面有大豆食心虫钻蛀痕迹的豆荚，用毛笔挑出老熟幼虫，将其放入盛有无水乙醇的离心管中，标明采集样品信息，-20℃的冰箱中保存备用。具体样品采集的地点、经纬度、海拔等信息详见表 1。

### 1.2 基因组 DNA 的提取

大豆食心虫单头老熟幼虫经双蒸水漂洗、吸水纸吸干、DNA 裂解液（100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0，25 mmol/L EDTA，500 mmol/L NaC1，1% SDS）裂解，之后用酚氯仿抽提法提取虫体基因组 DNA（Sambrook and Russell, 2001）。提取的 DNA 样品经琼脂糖凝胶电泳检测后保存于 -20℃冰箱中备用。

### 1.3 目的片段 PCR 扩增及电泳

本研究线粒体 COI PCR 所用的引物参照 Folmer 等（1994）的通用引物 LCO1490：5′-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3′和 HCO2198：5′-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3′。PCR 反应体系为 50 μL，其中 10 × PCR buffer 5 μL，dNTPs 4 μL，DNA 模板 3 μL，0.01 mmol/L 的上游和下游引物各 1 μL，Taq DNA 聚合酶（5 U/μL）0.5 μL。扩增条件为 94℃预变性 5 min；然后 94℃变性 45 s，53℃退火 50 s，72℃延伸 45 s，共 35 个循环；72℃后延伸 10 min，4℃保存。PCR 产物采用 1% 琼脂糖凝胶检测，然后在凝胶成像分析系统中观察并照相，记录结果。

### 1.4 PCR 产物的纯化回收及测序

按照 DNA 凝胶回收试剂盒说明书回收各样品 PCR 产物。回收产物委托北京华大基因研究中心进行 DNA 测序。

**表 1　栽培大豆为寄主的大豆食心虫不同地理种群样本信息**

**Table 1　Specimen data of difference geographic populations of *Leguminivora glycinivorella* on cultivated soybean**

| 种群代码 Population code | 样本数 Number of specimens | 采集地点 Collecting locality | 经度(E) Longitude | 纬度(N) Latitude | 海拔(m) Elevation | 采集时间 Collecting date |
|---|---|---|---|---|---|---|
| SY | 17 | 辽宁沈阳 Shenyang, Liaoning | 123°34′ | 41°49′ | 51 | 2013.10 |
| QQHR | 15 | 黑龙江齐齐哈尔 Qiqihar, Heilongjiang | 123°55′ | 47°22′ | 149 | 2013.9 |
| GZL | 15 | 吉林公主岭 Gongzhuling, Jilin | 124°49′ | 43°30′ | 212 | 2013.10 |
| DQ | 13 | 黑龙江大庆 Daqing, Heilongjiang | 125°10′ | 46°33′ | 149 | 2013.9 |
| DH | 10 | 吉林德惠 Dehui, Jilin | 125°57′ | 44°41′ | 174 | 2013.10 |
| HRB | 18 | 黑龙江哈尔滨 Harbin, Heilongjiang | 126°45′ | 45°43′ | 118 | 2013.9 |
| SH | 12 | 黑龙江绥化 Suihua, Heilongjiang | 126°56′ | 46°37′ | 175 | 2013.9 |
| HH | 24 | 黑龙江黑河 Heihe, Heilongjiang | 127°28′ | 50°15′ | 122 | 2013.9 |
| MDJ | 12 | 黑龙江牡丹江 Mudanjiang, Heilongjiang | 129°30′ | 44°25′ | 230 | 2013.9 |
| JMS | 17 | 黑龙江佳木斯 Jiamusi, Heilongjiang | 130°28′ | 46°49′ | 82 | 2013.9 |

### 1.5　数据统计与序列分析方法

应用分子进化遗传分析软件 MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011)对 DNA 序列进行序列比对及同源性分析,计算所得序列的碱基组成、保守位点、变异位点、简约信息位点、单一突变位点、转换碱基对、颠换碱基对数、转换和颠换的比值以及单倍型间的遗传距离。利用 DnaSP 5.0 软件 (Librado and Rozas, 2009)统计 COI 基因序列单倍型数目和出现的频率、单倍型多样度(*Hd*)、核苷酸多样度(*Pi*)、核苷酸平均差异数(*K*)、种群间遗传分化程度参数 *Fst* 和 *Gst*,并进行中性检验(Tajima, 1989)。根据线粒体基因特有公式 $Fst = 1/(1+2Nm)$ (Takahata and Palumbi, 1985; Goldberg and Ruvolo, 1997),推算基因流 *Nm* 值。根据经纬度计算出各采集地之间的地理距离。采用 Mega 5.0 对序列进行系统发育分析,根据 Kimura 2-Parameter 选用邻接法(NJ)(Felsenstein, 1985)构建大豆食心虫不同地理种群的分子系统进化树,进化树分支的置信度采用自展法(Bootstrap)重复检测 1 000 次。应用 Arlequin 3.5.1.2软件(Excoffier *et al.*, 2005),根据 Pairwise difference 模型,计算种群间的分化指数(*Fst*) 和分子方差分析以评估种群之间、种群内的遗传分化。采用 Network 4.6 程序(Bandelt *et al.*, 1999) 构建种群内所有单倍型的中介网络图。

## 2　结果与分析

### 2.1　大豆食心虫 COI 基因的碱基组成及序列分析

以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,从所有测序的样品中均得到一条特异的 PCR 产物,最后得到 657 bp 的 COI 基因序列(表 2)。测序结果在 NCBI 中用 BLAST 进行相似性检索,与胡桃小卷蛾 *Cydia caryana* COI 基因序列(GenBank 登录号:GU088344.1)的核苷酸一致性为 93%,为所需目的片段。

本研究共获得 153 条序列,均没有碱基的缺失和插入,其中保守位点(conserved sites) 621 个,变异位点(variable sites)36 个(表 2),变异百分率为 5.48%,突变总数(total number of mutation)为 37。其中简约信息位点(parsimony informative sites)24 个,单一变异位点(singleton variable sites)12 个。所测序列中 COI 基因碱基组成为:A 30.3%, T 37.8%, C 17.0% 和 G 14.9%, A+T 含量为68.1%, G+C 含量为 31.9%,表现出明显的碱基 A/T 偏倚性,符合昆虫线粒体基因序列碱基组成特点(Jermiin and Crozier, 1994)。所有的核苷酸替换分析表明,转换(transition)占 88.89%,其中 A 与 G 之间的转换占 22.22%, C 与 T 之间的转换占 66.67%;颠换

(transversion)发生频率较转换低为 11.11% ;总体变异位点中转换与颠换的比值为 8:1,与亲缘关系较近的分类阶元之间核苷酸替换表现为转换大于颠换的变异特点(Simon *et al*., 1994)一致。

**表 2 大豆食心虫不同单倍型的 COI 基因序列变异**

**Table 2 Sequence variations of different haplotypes of COI gene in *Leguminivora glycinivorella***

| 单倍型 Haplotype | 变异位点 Variable sites | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 039 | 048 | 072 | 075 | 132 | 159 | 196 | 210 | 249 | 270 | 273 | 282 | 301 | 312 | 327 | 333 | 354 | 363 |
| H1 | A | C | A | A | C | G | T | A | C | C | C | A | G | C | T | A | T | C |
| H2 | . | T | . | . | . | A | . | G | T | T | . | . | A | T | A | . | C | T |
| H3 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T |
| H4 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T |
| H5 | . | T | . | . | . | A | . | G | T | T | . | . | A | T | A | . | C | T |
| H6 | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | A | . | . | . | . | . |
| H7 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | G | . | . |
| H8 | . | . | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| H9 | . | . | . | G | . | . | . | . | . | . | . | G | . | T | . | . | . | . |
| H10 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . |
| H11 | . | . | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| H12 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T |
| H13 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| H14 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . |
| H15 | G | . | . | G | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| H16 | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| H17 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . |

| 单倍型 Haplotype | 变异位点 Variable sites | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 369 | 396 | 447 | 459 | 471 | 489 | 498 | 499 | 540 | 567 | 573 | 575 | 579 | 600 | 615 | 624 | 633 | 639 |
| H1 | T | C | C | C | T | T | C | T | C | C | T | T | C | C | T | G | C | T |
| H2 | A | T | T | T | C | C | . | C | . | T | . | . | . | T | . | . | T | . |
| H3 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| H4 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | C |
| H5 | A | T | T | T | C | C | . | C | . | T | . | . | . | T | . | T | T | . |
| H6 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| H7 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | . | . |
| H8 | . | . | . | . | C | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | T | . |
| H9 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| H10 | . | . | T | . | . | . | T | . | T | . | . | . | . | . | . | A | . | . |
| H11 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| H12 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | C | A | . | . |
| H13 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | A | . | C |
| H14 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| H15 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . |
| H16 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | T | . | . | . | . | . |
| H17 | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | . | G | . | . | . | . | . | . |

序列全长为 657 bp,对齐后有 36 个变异位点。H1 ~ H17 为大豆食心虫的 17 个单倍型,没有碱基的缺失和插入。点号表示相同的碱基。Thirty six variable sites were defined from the alignments with a total of 657 bp in length. H1 – H17 refer to the 17 haplotypes of *L. glycinivorella*; no deletion/insertion was found; identical bases are indicated by dot.

## 2.2　大豆食心虫不同地理种群 COI 基因的单倍型、核苷酸多样度和中性检验分析

上述 153 条 COI 基因序列检测出 17 种单倍型，分别命名为 H1 ~ H17（GenBank 登录号：KJ528252 ~ KJ528258；KJ540168 ~ KJ540177）。对各种群单倍型数进行多样性分析和 Tajima's *D* 分析（表 3）表明，单倍型 H1 出现频率最高为 73.2%（112/153），且被 10 个地理种群所共享，而牡丹江（MDJ）的全部个体均属于该单倍型。其次是单倍型 H2 出现的频率较高，约占 8.5%（13/153），为 4 个地理种群所共有。H12 有 6 个个体，H4 有 4 头个体，H5 有 2 头个体，H3 有 3 头个体，H6 有 3 头个体，剩余其他单倍型仅有一个个体，属于稀有单倍型。

根据 DnaSP5.0 软件分析结果表明，总种群单倍型多样度（haplotype diversity, *Hd*）为 0.456，核苷酸多样度（nucleotide diversity, *Pi*）为 0.00676（Smith *et al.*, 2006），核苷酸平均差异数（average number of nucleotide differences, *K*）为 4.440。不同地理种群的单倍型多样度在 0 ~ 0.634 之间，核苷酸多样度在 0 ~ 0.01435 之间（表 3），其中牡丹江种群各项参数均为 0。从 Tajima's *D* 检测结果可以得出（表 3），10 个种群的中性检验结果均不显著，且总种群的 Tajima's *D* 值为 −0.97226，结果不显著（$P > 0.10$）（Harpending *et al.*, 1998），说明中国东北三省地区大豆食心虫总体上在较近的历史时期未经历明显的种群扩张。

**表 3　大豆食心虫不同地理种群 COI 基因单倍型多样度、核苷酸多样性分析及 Tajima's *D* 中性检验**

**Table 3　COI haplotype diversity, nucleotide diversity and Tajima's *D* test in different geographic populations of *Leguminivora glycinivorella***

| 种群代码 Population code | 单倍型分布 Haplotype distribution (*h*) | 单倍型多样度 Haplotype diversity (*Hd*) | 核苷酸多样度 Nucleotide diversity (*Pi*) | 核苷酸平均差异数 Average number of nucleotide differences (*K*) | 中性检验 Tajima's *D* | 中性检测显著性 Statistical significance |
|---|---|---|---|---|---|---|
| DQ | H1(12)H7(1) | 0.154 | 0.00047 | 0.308 | −1.46802 | $P > 0.10$ |
| DH | H1(8)H9(1)H10(1) | 0.378 | 0.00237 | 1.556 | −1.57285 | $0.10 > P > 0.05$ |
| GZL | H1(11)H2(2)H5(2) | 0.457 | 0.01377 | 9.048 | 1.39133 | $P > 0.10$ |
| HEB | H1(12)H6(3)H11(1) H14(1)H15(1) | 0.549 | 0.00157 | 1.033 | −1.34337 | $P > 0.10$ |
| HH | H1(14)H3(3)H4(4) H12(2)H13(1) | 0.634 | 0.00186 | 1.221 | 0.38263 | $P > 0.10$ |
| JMS | H1(10)H2(2)H12(4) H8(1) | 0.618 | 0.00907 | 5.956 | −0.64641 | $P > 0.10$ |
| MDJ | H1(12) | 0 | 0 | 0 | – | – |
| QQHE | H1(11)H2(4) | 0.419 | 0.01339 | 8.800 | 1.49070 | $P > 0.10$ |
| SY | H1(11)H2(5)H17(1) | 0.522 | 0.01435 | 9.426 | 1.78892 | $0.10 > P > 0.05$ |
| SH | H1(11)H16(1) | 0.167 | 0.00076 | 0.500 | −1.62929 | $0.10 > P > 0.05$ |
| 总种群 Total population | | 0.456 | 0.00676 | 4.440 | −0.97226 | $P > 0.10$ |

为了进一步分析这 10 个地理种群的遗传多样性，运用 Kimura 2-Parameter 对已获得的 153 条 COI 基因序列进行了不同单倍型之间的遗传距离的分析（表 4），不同单倍型间遗传距离为 0.002 ~ 0.038 之间，平均遗传距离为 0.012，其中 H2 和 H5 单倍型的遗传距离都大于 0.031，均达到了较高的水平。

## 2.3　大豆食心虫不同地理种群间的遗传多样性、基因流及遗传分化分析

利用固定系数 *Fst* 和基因流 *Nm* 对种群间的基因差异程度及交流程度（Hudson *et al.*, 1992）进行分析。根据 DnaSP 5.0 计算的结果表明，总种群的 *Fst* 为 0.12545，*Gst* 为 0.06326，总基因流 *Nm* 为 3.49，且各种群间的基因流均大于 1（表 5），说明群体间基因交流的水平较高，通过某种渠道群体间可以发生基因交流，种群间还未产生明显的分化。各种群间的核苷酸差异数（*Kxy*）在 0.1539 ~ 8.7020 之间，平均值为 4.3276；核苷酸歧异度（*Dxy*）在 0.0002 ~ 0.0132 范围内，平均值为 0.0066；遗传分化系数（*Gst*）在 −0.0252 ~ 0.1280 之间，其平均值为 0.0355；种群间固定系数（*Fst*）在 −0.0692 ~ 0.2512，平均值为 0.1147。

应用 Arlequin 3.5.1.2 软件进行 AMOVA 分子变异分析（表 6）表明，10 个地理种群之间的方差组分为 0.27252，占方差比率的 12.13%；而种群内

**表 4 大豆食心虫 COI 基因不同单倍型间的遗传距离**

**Table 4 Genetic distance of different haplotypes of COI gene of *Leguminivora glycinivorella***

| | H1 | H2 | H3 | H4 | H5 | H6 | H7 | H8 | H9 | H10 | H11 | H12 | H13 | H14 | H15 | H16 | H17 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| H1 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| H2 | 0.033 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| H3 | 0.002 | 0.031 | | | | | | | | | | | | | | | |
| H4 | 0.003 | 0.033 | 0.002 | | | | | | | | | | | | | | |
| H5 | 0.035 | 0.002 | 0.033 | 0.035 | | | | | | | | | | | | | |
| H6 | 0.003 | 0.030 | 0.005 | 0.006 | 0.031 | | | | | | | | | | | | |
| H7 | 0.003 | 0.036 | 0.005 | 0.006 | 0.038 | 0.006 | | | | | | | | | | | |
| H8 | 0.005 | 0.031 | 0.006 | 0.008 | 0.033 | 0.008 | 0.008 | | | | | | | | | | |
| H9 | 0.005 | 0.031 | 0.006 | 0.008 | 0.033 | 0.008 | 0.008 | 0.009 | | | | | | | | | |
| H10 | 0.008 | 0.035 | 0.009 | 0.011 | 0.035 | 0.011 | 0.011 | 0.012 | 0.009 | | | | | | | | |
| H11 | 0.003 | 0.036 | 0.005 | 0.006 | 0.038 | 0.006 | 0.006 | 0.008 | 0.008 | 0.011 | | | | | | | |
| H12 | 0.005 | 0.035 | 0.003 | 0.005 | 0.035 | 0.008 | 0.008 | 0.009 | 0.009 | 0.009 | 0.008 | | | | | | |
| H13 | 0.003 | 0.036 | 0.005 | 0.003 | 0.036 | 0.006 | 0.006 | 0.008 | 0.008 | 0.008 | 0.006 | 0.005 | | | | | |
| H14 | 0.002 | 0.035 | 0.003 | 0.005 | 0.036 | 0.005 | 0.005 | 0.006 | 0.006 | 0.009 | 0.005 | 0.006 | 0.005 | | | | |
| H15 | 0.002 | 0.035 | 0.003 | 0.005 | 0.036 | 0.005 | 0.005 | 0.006 | 0.006 | 0.009 | 0.005 | 0.006 | 0.005 | 0.003 | | | |
| H16 | 0.005 | 0.035 | 0.006 | 0.008 | 0.036 | 0.008 | 0.008 | 0.009 | 0.003 | 0.012 | 0.008 | 0.009 | 0.008 | 0.006 | 0.006 | | |
| H17 | 0.003 | 0.033 | 0.005 | 0.006 | 0.034 | 0.006 | 0.006 | 0.008 | 0.005 | 0.008 | 0.006 | 0.008 | 0.006 | 0.005 | 0.005 | 0.008 | |

**表 5 大豆食心虫不同地理种群间的基因流 *Nm***

**Table 5 Gene flow (*Nm*) between pairwise populations of *Leguminivora glycinivorella***

| | DQ | DH | GZL | HEB | HH | JMS | MDJ | QQHE | SY | SH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DQ | | | | | | | | | | |
| DH | 20.9592 | | | | | | | | | |
| GZL | 1.9343 | 2.6368 | | | | | | | | |
| HEB | 8.5416 | 10.5375 | 2.3539 | | | | | | | |
| HH | 2.1096 | 3.8898 | 2.1867 | 2.5562 | | | | | | |
| JMS | 4.1773 | 7.3370 | 80.1452 | 5.2013 | 9.2847 | | | | | |
| MDJ | inf | 17.4856 | 1.8697 | 6.5822 | 1.6853 | 3.9723 | | | | |
| QQHE | 1.8969 | 2.5656 | inf | 2.3153 | 2.1205 | 53.2634 | 1.8332 | | | |
| SY | 1.5392 | 2.0419 | inf | 1.8364 | 1.7272 | 13.6643 | 1.4904 | inf | | |
| SH | inf | inf | 2.0484 | 9.7669 | 2.3752 | 4.5403 | inf | 2.0126 | 1.6204 | |

inf: 无限大 Infinite.

**表 6 豆食心虫 10 个地理种群线粒体 COI 基因的分子变异分析**

**Table 6 Analysis of molecular variance (AMOVA) of mitochondrial COI gene in 10 geographic populations of *Leguminivora glycinivorella***

| 变异来源 Source of variation | 自由度 *df* | 平方和 Sum of sequences | 方差组分 Variance components | 变异百分率 Percentage of variation |
|---|---|---|---|---|
| 种群间 Among populations | 9 | 55.043 | 0.27252Va | 12.13 |
| 种群内 Within a population | 143 | 282.408 | 1.97488Vb | 87.87 |
| 总变异 Total variance | 152 | 337.451 | 2.24740 | |

部的方差组分为 1.97488,占方差比率的 87.87%,种群内部的遗传变异远大于种群间的遗传变异,说明中国东北地区大豆食心虫的种群遗传分化主要来自种群内部,而不是种群间。

Kimura 2-Paramter 模型分析大豆食心虫不同地理种群遗传距离表明(表 7),不同地理种群遗传距离在 0 ~ 0.2909 之间。而遗传距离和地理距离的 Mantel 相关性分析表明(图 1),各种群之间的遗传距离和地理距离之间未呈现出显著相关性($r$ = 0.210, $P$ = 0.913 > 0.05),说明大豆食心虫不同地理种群间的遗传距离不是由地理距离远近决定的。

## 2.4 大豆食心虫不同地理种群 COI 基因单倍型系统发育分析

按照种内遗传差异以选择亲缘关系较近的种为

**表 7　大豆食心虫 10 个地理种群间的地理距离(km)的自然对数值(上三角)与遗传距离(下三角)**

**Table 7　The natural logarithm of geographical distance (km) (above the diagonal) and pairwise genetic distance (below the diagonal) among 10 geographic populations of *Leguminivora glycinivorella***

| | DQ | DH | GZL | HEB | HH | JMS | MDJ | QQHE | SY | SH |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DQ | | 7.76 | 8.41 | 7.18 | 8.83 | 8.03 | 9.02 | 9.32 | 9.23 | 6.81 |
| DH | 0.0239 | | 7.23 | 7.06 | 9.35 | 8.64 | 8.65 | 7.27 | 9.12 | 7.85 |
| GZL | 0.2585 | 0.1896 | | 8.15 | 9.63 | 8.76 | 8.22 | 8.45 | 8.54 | 8.57 |
| HEB | 0.0585 | 0.0474 | 0.2124 | | 9.05 | 9.18 | 8.65 | 8.79 | 7.80 | 6.71 |
| HH | 0.2370 | 0.1285 | 0.2287 | 0.1956 | | 8.32 | 8.03 | 8.22 | 8.98 | 8.73 |
| JMS | 0.1197 | 0.0681 | 0.0063 | 0.0961 | 0.0539 | | 9.40 | 8.73 | 9.98 | 8.16 |
| MDJ | 0.0000 | 0.0286 | 0.2674 | 0.0760 | 0.2967 | 0.1259 | | 9.12 | 9.62 | 8.32 |
| QQHE | 0.2636 | 0.1949 | 0.0000 | 0.2160 | 0.2358 | 0.0094 | 0.2728 | | 9.17 | 7.95 |
| SY | 0.3249 | 0.2449 | 0.0000 | 0.2723 | 0.2895 | 0.0366 | 0.3355 | 0.0000 | | 9.23 |
| SH | 0.0000 | 0.0000 | 0.2441 | 0.0512 | 0.2105 | 0.1101 | 0.0000 | 0.2484 | 0.3086 | |

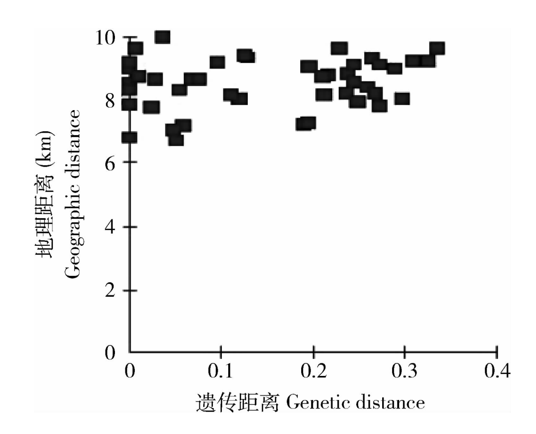



图 1　大豆食心虫 10 个地理种群的遗传距离与地理距离的 Mantel 检验

Fig. 1　Mantel test between genetic distance and geographic distance among 10 populations of *Leguminivora glycinivorella*

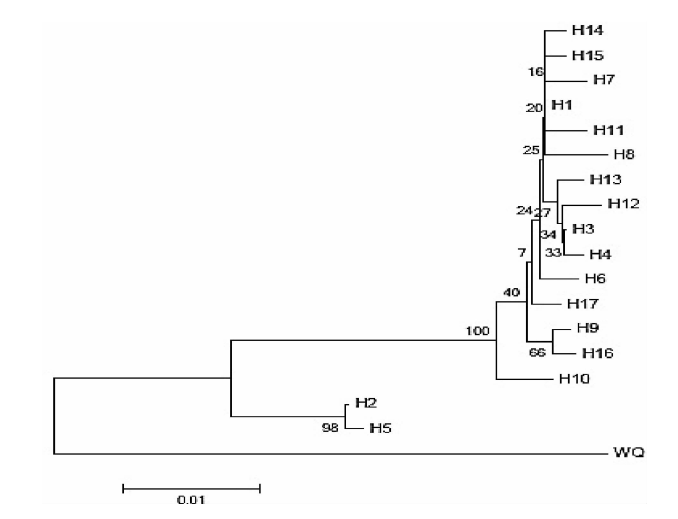



图 2　邻接法构建大豆食心虫不同地理种群 COI 基因单倍型间系统树

Fig. 2　Neighbor-joining phylogenetic tree of haplotypes of mitochondrial COI gene in different geographic populations of *Leguminivora glycinivorella* based on nucleotide sequence

以胡桃小卷蛾为外群。*Cydia caryana* was used as the outgroup.

外群的原则,运用 Kimura 2-Parameter 模型邻接法(Neighbor-joining, NJ),以同科胡桃小卷蛾 *Cydia caryana* COI 基因序列(GenBank 登录号:GU088344.1)作为外群,与 17 个大豆食心虫 COI 基因单倍型进行构树。结果显示,本研究获得的 17 个单倍型处于平行地位,且都与外群分开,形成了 2 个较为明显的支系,单倍型 H5 和 H2 聚为一支,其余单倍型聚为一支。尽管有距离较近的地理种群的单倍型聚为一支(如 HEB 的 H11 和 DQ 的 H7),但也有距离较远的地理种群的单倍型聚为一支(如 GZL 的 H5 和 JMS 的 H2),单倍型之间未显示出明显的地理谱系,各分支置信度也较低。总体来看,系统发育树并未反映出与地理位置相关的信息,未形成明显的系统地理结构(图 2)。

单倍型网络中介图能进一步说明各单倍型之间的关系,利用 Network 4.6 程序构建单倍型网络中介图(图 3),根据结果可知,单倍型 H1 与其他单倍型关系紧密,为 10 个地理种群的共享单倍型,单倍型 H2 和 H5 与其他单倍型有明显分支,与发育树结果吻合(图 2)。单倍型的分布与其所在的地理种群之间不存在明显的对应关系,大多数单倍型都处于较为混杂的分布格局中。其结果更加验证了 2.3 节的分析,说明种群间遗传分化主要来自种群内部,种群间遗传分化相对较小。

## 3　讨论

本研究利用 mtDNA COI 基因片段中进化速率较

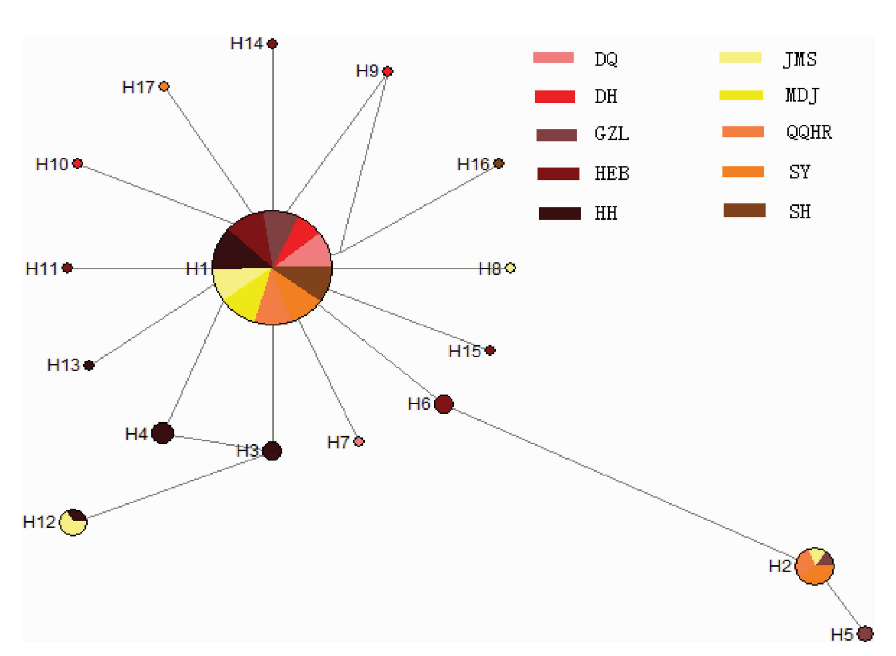



图 3　大豆食心虫线粒体 COI 基因各单倍型的中介网络图

Fig. 3　Median-joining haplotype network of *Leguminivora glycinivorella* based on COI gene of mtDNA

圆面积代表单倍型出现频率,彩色扇形面积代表各样品种群在同一单倍型中所占的比例。Circle areas are proportional to haplotype frequencies, while colored portions represent the proportions of the same haplotype that occurs in each sampling region.

快的一段序列作为分子标记(Bensasson *et al*., 2000),对东北三省大豆食心虫危害较重的 10 个地理种群内和种群间的遗传多样性进行了分析。在 10 个地理种群中共获得 COI 基因序列 153 条,分成 17 个单倍型,其中只有单倍型 H1 为共享单倍型,说明该单倍型是能够在种群中稳定存在的优势单倍型(张立勋等,2005),其可能是大豆食心虫进化史上出现的较为稳定、环境适应性较强的一种单倍型。而各种群的独有单倍型说明种群间存在着一定程度的遗传分化。在众多影响种群遗传多样性的因素中,历史因素在种群进化中发挥很大的作用(Xiao *et al*., 2009; Yamaguchi *et al*., 2010)。本研究中总群体和各种群的 Tajima's *D* 检验结果皆不显著,表明这 10 个地理种群的大豆食心虫在较近的历史时期内并未出现种群扩张和持续增长的现象,种群大小保持相对稳定的状态。

本研究中总种群单倍型多态度处于中低等水平,说明大豆食心虫对变化的外界环境的适应能力相对较弱,这可能与其生物学特性有关。根据李春选等(2003)应用等位酶的分析可知,昆虫会因其生物学特性及对栖息环境的依赖程度,体现出不同的遗传多样性水平。推测大豆食心虫因其栖息环境、食物的选择较为局限,生存环境比较单一,造成了大豆食心虫种群内相对较低的遗传多样性。而单倍型多样度和核苷酸多样度在各种群中存在差异,可能是由于大豆食心虫在中国东北的分布范围较为广泛,所处的自然生态条件不同,在自然选择的作用下导致不同地理种群的遗传结构发生改变,而种群的遗传结构与物种内基因交流程度的关系是重要的进化生态学问题(祖元刚等,1999)。从本研究结果来看,黑河地区种群遗传多样性最为丰富,其次为佳木斯种群。有研究表明,大豆食心虫属"长日照昆虫",在每日光照小于 15 h 出现滞育,在其盛发期 7-8 月份,高纬度的黑河地区光照时间长于低纬度的哈尔滨等地区,因此,高纬度的黑河地区大豆食心虫发生期早于低纬度的哈尔滨等地区(张武等,2013)。由此可以推测,不同分布区的大豆食心虫发生规律也可能是导致其遗传多样性发生变化的原因之一。另外,本研究在各地区采用随机取样的方法进采集,关于不同品种寄主植物是否会对大豆食心虫的生物学特性等方面产生影响的研究目前尚没有报道,但国外有研究表明母管蓟马属 *Mesothrips* 的蓟马种类在榕属 *Ficus* 不同品种寄主上其行为特性和生活史等也不相同(Tree and Walter, 2009)。所以基于上述研究分析,可能本研究所选的栽培品种由于连年重茬等寄主植物自身的因素会对大豆食心虫种群间遗传多样性和基因交流具有一定的影响。

基因流 *Nm* 和遗传分化指数 *Fst* 可以揭示种群

间可能存在的基因渗透和影响遗传分化的遗传现象（Rousset，1997）。本研究的基因流 *Nm* 为 3.49 > 1，且各种群内部的 *Nm* 值均大于 1，说明种群间和种群内的基因交流频繁。遗传分化指数 *Fst* 较低，遗传分化不明显，这与大豆食心虫群体间基因交流程度较高的结论相对应。此结果表明，种群间的基因交流程度并不完全是由昆虫的迁飞能力决定的，迁飞能力弱或者是无迁飞能力的昆虫其种群间也可以通过某些渠道进行基因交流。大豆食心虫成虫的飞翔能力虽然弱，但也不排除其能随气流扩散的可能性，目前国内外还没有大豆食心虫成虫扩散等方面的详细研究。但是随着外界环境的压力和种群结构的变化，种群间或种群内是否会发生某种遗传分化，有待于进一步的研究。一个物种对环境变化的适应能力主要取决于其群体内部的遗传多样性水平和相应的遗传结构（祖元刚等，1999）。从本研究结果来看，大豆食心虫的遗传变异主要来自种群内部而不是种群间，说明大豆食心虫需要在种群内通过遗传变异来抵抗外界环境的变化，使其种群在自然选择的作用下能够稳定存在。

本研究所分析的 10 个大豆食心虫地理种群，均为大豆食心虫的主要危害区及栽培大豆的主要种植产区，地理距离存在一定的跨度，但相关性检验结果说明遗传距离与地理距离之间没有显著线性相关性。综合上述结果可知，大豆食心虫各种群间的基因交流并未受到地理距离的影响，地理距离并不能解释种群间的遗传变异。本研究工作在一定程度上为大豆食心虫的系统进化研究提供了分子水平上的理论依据，为进一步研究中国大豆食心虫的遗传多样性及其种群分化程度提供了理论和实验数据。本研究仅以线粒体 COI 基因作为分子标记进行检测，且采集地点仅为中国东北三省。因此，若要全面了解中国大豆食心虫的遗传变异和地理种群分化程度及分化格局，还需要进一步扩大采样范围和样本量；同时采用更多的分子标记进行验证，才能更加全面地了解大豆食心虫各分布地区的种群间关系和遗传机制。

## 参考文献（References）


Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC, 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 489－522.

Bandelt HJ, Forster P, Rohl A, 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 16(1): 37－48.

Barrio E, Latorre A, Moya A, Ayala FJ, 1992. Phylogenetic reconstruction of the *Drosophila obscura* group, on the basis of mitochondrial DNA. *Mol. Biol. Evol.*, 9(4): 621－635.

Bensasson D, Zhang DX, Hewitt GM, 2000. Frequent assimilation of mitochondrial DNA by grasshopper nuclear genomes. *Mol. Biol. Evol.*, 17(3): 406－415.

Excoffier L, Laval G, Schneider S, 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolution Bioinformatics*, 1: 47－50.

Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies, an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783－791.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R, 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidae subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294－299.

Goldberg TL, Ruvolo M, 1997. The geographic apportionment of mitochondrial genetic diversity in east African chimpanzees, Pan troglodytes schwein furthii. *Mol. Biol. Evol.*, 14(9): 976－984.

Harpending HC, Batzer MA, Gurven M, Jorde LB, Rogers AR, Sherry ST, 1998. Genetic traces of ancient demography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(4): 1961－1967.

Harrison HR, 1989. Animal mtDNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol. Evol.*, 4(1): 6－11.

Hudson RR, Slatkin M, Maddison WP, 1992. Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics*, 132: 583－589.

Jermiin LS, Crozier RH, 1994. The cytochrome b region in the mitochondrial DNA of the ant *Tetraponera rufoniger*: sequence divergence in Hymenoptera may be associated with nucleotide content. *J. Mol. Evol.*, 38: 282－294.

Li CX, Ma EB, Zheng XY, 2003. Genetic differentiation of different populations of four locust species in China. *Acta Genetica Sinica*, 30(3): 234－244.［李春选，马恩波，郑先云，2003. 中国 4 种蝗虫不同种群的遗传分化. 遗传学报，30(3): 234－244］

Li J, Zhang Y, Wang ZY, He KL, Wang Q, 2010. Genetic differentiation and gene flow among different geographical populations of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis* (Lepidoptera: Crambidae) in China estimated by mitochondrial CO II gene sequences. *Acta Entomologica Sinica*, 53(10): 1135－1143.［李菁，张颖，王振营，何康来，王强，2010. 基于线粒体 DNA CO II 基因的亚洲玉米螟中国不同地理种群遗传分化及基因流研究. 昆虫学报，53(10): 1135－1143］

Librado P, Rozas J, 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451－1452.

Miya M, Takeshima H, Endo H, Ishiguro NB, Inoue JG, Mukai T, Satoh TP, Yamaguchi M, Kawaguchi A, Mabuchi K, Shirai SM, Nishida M, 2003. Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 26: 121－138.

Rousset F, 1997. Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145: 1219－1228.

Sambrook J, Russell DW, 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Simon C, Frati F, Beckenbach AT, Crespi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction. primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 87: 651–701.

Smith MA, Woodley NE, Janzen DH, Hallwachs W, Hebert PDN, 2006. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(10): 3657–3662.

Sun W, Zhang ZT, Dong H, Qian HT, Shi Y, Xie LN, Cong B, 2013. Analysis of genetic differentiation and gene flow among different geographic populations of *Oedaleus infernalis* (Orthoptera: Acrididae) based on mtDNA COI gene sequences. *Acta Entomologica Sinica*, 56(8): 907–916. [孙嵬, 张柱亭, 董辉, 钱海涛, 石玉, 谢丽娜, 丛斌, 2013. 基于线粒体 COI 基因序列的黄胫小车蝗不同地理种群的遗传分化及基因流分析. 昆虫学报, 56(8): 907–916]

Tajima F, 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585–595.

Takahata N, Palumbi SR, 1985. Extranuclear differentiation and gene flow in the finite island model. *Genetics*, 109: 441–457.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA 5, molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28: 2731–2739.

Tree DJ, Walter GH, 2009. Diversity of host plant relationships and leaf galling behaviours within a small genus of thrips – *Gynaikothrips* and *Ficus* in south east Queensland, Australia. *Australian Journal of Entomology*, 48: 269–275.

Wei SJ, Chen XX, 2011. Progress in research on the comparative mitogenomics of insects. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 48(6): 1573–1585. [魏书军, 陈学新, 2011. 昆虫比较线粒体基因组学研究进展. 应用昆虫学报, 48(6): 1573–1585]

Wolstenholme DR, 1992. Genetic novelties in mitochondrial genomes of multicelluar animals. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 2: 918–925.

Wu BZ, 2001. Study of new methods of prevention and control of *Leguminivora glycinivorella*. *Soybean Bulletin*, (3): 9. [吴炳芝, 2001. 大豆食心虫防治新方法的研究. 大豆通报, (3): 9]

Xiao YS, Zhang Y, Gao TX, Yanagimoto T, Yabe M, Sakurai Y, 2009. Genetic diversity in the mitochondrial DNA control region and population structure in the small yellow croaker *Larimichthys polyactis*. *Environ. Biol. Fish.*, 85: 303–314.

Xu DD, Lou B, Shi HL, Geng Z, Li SL, Zhang YR, 2012. Genetic diversity and population structure of *Nibea albiflora* in the China Sea revealed by mitochondrial COI sequences. *Biochemical Systematics and Ecology*, 45: 158–165.

Xu Q, Liu R, Liu Y, 2009. Genetic population structure of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* in the East China Sea based on mtDNA 16S rRNA sequences. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 371: 121–129.

Yamaguchi K, Nakajima M, Taniguchi N, 2010. Loss of genetic variation and increased population differentiation in geographically peripheral populations of Japanese char *Salvelinus leucomaenis*. *Aquaculture*, 308: S20–S27.

Yang X, Zhao KJ, Wang KQ, Han LL, Yang S, 2012. Observation on antennal sensillia of *Leguminivora glycinivorella* with scanning electron microscope. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 49(5): 1321–1326. [杨啸, 赵奎军, 王克勤, 韩岚岚, 杨帅, 2012. 大豆食心虫触角感器的扫描电镜观察. 应用昆虫学报, 49(5): 1321–1326]

Zhang LX, Ruan LZ, An B, Liu NF, 2005. Genetic structure and geographic variance of the Tibetian snowcock Przewalsky's subspecies *Tetraogallus tibetanus przewalskii* populations. *Acta Zoologica Sinica*, 51(6): 1044–1049. [张立勋, 阮禄章, 安蓓, 刘迺发, 2005. 西藏雪鸡青海亚种的种群遗传结构和地理变异. 动物学报, 51(6): 1044–1049]

Zhang W, Li BH, Li HP, Li YJ, 2013. Occurrence regularity of *Leguminiviora glycinivorella* during 2009–2012 in Heihe Region. *Crops*, (4): 146–148. [张武, 李宝华, 李红鹏, 李艳杰, 2013. 黑河地区 2009~2012 年大豆食心虫发生规律研究. 作物杂志, (4): 146–148]

Zu YG, Sun M, Kang L, 1999. The Theory, Method, and Application of Molecular Ecology. Higher Education Press, Beijing. 30–37. [祖元刚, 孙梅, 康乐, 1999. 分子生态学理论、方法和应用. 北京: 高等教育出版社. 30–37]

（责任编辑：袁德成）